

PCT/JP99/03551

EU

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

01.07.99

REC'D 20 AUG 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 8月18日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第232153号

出 願 人

Applicant(s):

農林水産省農業生物資源研究所長

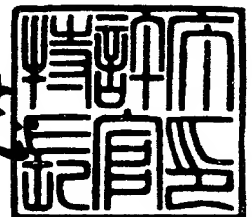
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 7月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山 建 志



出証番号 出証特平11-3051762

【書類名】 特許願

【整理番号】 MOA-004

【提出日】 平成10年 8月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/29

【発明の名称】 サテライト配列の単離方法

【請求項の数】 8

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2 農林水産省農業生物資源研究所内

    【氏名】 高橋 秀彰

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県鹿島郡波崎町海老台 水産庁水産工学研究所内

    【氏名】 關野 正志

【特許出願人】

    【識別番号】 591127076

    【氏名又は名称】 農林水産省農業生物資源研究所長 桂 直樹

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

特平 10-232153

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サテライト配列の単離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次のステップ a) - b) を含むサテライト配列の単離方法であって、塩基配列に依存しない方法に基づいてゲノムを切断するサテライト配列の単離方法。

a) ゲノムをランダムに切断した断片を得る工程、および

b) 工程 a) の断片から、サテライト配列を含む断片を選択する工程、

【請求項 2】 塩基配列に依存しない方法が、物理的な切断方法、または酵素的な切断方法である請求項 1 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 3】 物理的な切断方法が超音波処理である請求項 2 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 4】 超音波処理によって断片化されたゲノムの切断面を平滑末端とする請求項 3 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 5】 前記平滑末端処理を Mung beanヌクレアーゼ処理および T4DNAポリメラーゼ処理により実施する請求項 4 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 6】 酵素的な切断方法が、塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼによるものである請求項 2 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 7】 塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼが、DNaseIである請求項 6 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 8】 サテライト配列が、マイクロサテライト配列である請求項 1 のサテライト配列の単離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、サテライト配列の単離方法に関する。集団遺伝マーカーとして有用なサテライト配列は、遺伝連鎖解析等のマーカーとなる。したがって、その効率的な単離技術は、ゲノム解析における重要な研究課題である。

【0002】

## 【従来の技術】

真核生物のゲノムには、類似した塩基配列の繰り返しで構成された反復配列の存在が知られていた。最初に発見されたのはサテライトDNAと呼ばれる数百-数千に及ぶ長い配列を1つの繰り返し単位とするものでサテライト配列(Bioscience, 27:790-796, 1977)と呼ばれている。その後、より短い配列で構成された反復配列も確認された。それらは、繰り返し単位の大きさに応じて、2-5塩基の繰り返し単位(Nucleic Acid Res. 9:5931-5947, 1981)を持つマイクロサテライト配列(Am. J. Hum. Genet. 4:397-401, 1989)、そして10-64塩基の繰り返し単位(Nature, 295:31-35, 1982)を持つミニサテライト配列(Nature, 314:67-73, 1985)と名づけられた。マイクロサテライト配列は、シンプルシーケンス(Nucleic Acid Res. 17:6463-6471, 1989)、あるいはショートタンデムリピート(Am. J. Hum. Genet. 49:746-756)などとも呼ばれている。

## 【0003】

マイクロサテライト配列は、発見当初はマーカーとしての利用は報告されなかった。しかし、Polymerase Chain Reaction(PCR)によって多型が確認(Am. J. Hum. Genet. 4:397-401, 1989)されてからは、さまざまな分野でマーカーとして注目されるようになった。具体的には、人間や動植物の家系・系統判別や個体識別などへの応用が進んでいる。マイクロサテライト配列はゲノム全体に散在し、しかも変異に富むことから遺伝マーカーとして優れている。またマイクロサテライトDNA多型は、多型遺伝子座数や1遺伝子座当たりの対立遺伝子数が多い。更にPCRに基づいていることから操作が簡単であること、また増幅産物は電気泳動によって1本、あるいは2本のバンドとして検出されるので型判別が容易で、処理能力にも優れていた。こうしてマイクロサテライトDNAマーカーは、もっとも有効な集団遺伝マーカーとして広く普及した(J. Fish. Biol., 47:29-55, 1995)。

## 【0004】

マイクロサテライトDNA多型解析を行うには、まず多数のマイクロサテライトDNAを基本的には解析対象である種ごとに単離しておく必要がある。そしてマイクロサテライト多型の検出にあたっては、PCRでマイクロサテライトDNA領域を増幅しなければならない。PCRには、適切なプライマーが必要である。つまり、マイ

クロサテライトDNA多型解析を行うには、その種のマイクロサテライトDNAの単離と、マイクロサテライト領域を増幅することができるPCR用のプライマーの設計を効率的に行う方法が求められる。

【0005】

マイクロサテライト多型解析が進んでいない家禽類について、本発明者らは効率的なマイクロサテライトの単離が期待できる方法を既に報告している(Jpn. Poult. Sci., 33, 292-299, 1996)。この方法は、それまでマイクロサテライト配列の一般的な単離方法であった、ゲノムの制限酵素による断片化、ベクターへの挿入、(TG)<sub>n</sub>プライマーによる伸長反応、そしてクローニングという一連の操作に基づく方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 3419-1423, 1992)を改良したものである。すなわち、形質転換効率の高いベクターの選択、Mung beanヌクレアーゼによる1本鎖DNAの特異的な消化、あるいはDNaseIとRNaseAによる大腸菌由来のDNAやRNAの除去等を行って、未知のマイクロサテライト配列の単離を達成した。ニワトリではマイクロサテライト配列の数が少なく、効率的なマイクロサテライト配列の単離は困難とされている。この方法により、ニワトリのマイクロサテライト配列の単離を試みた公知の方法(Poultry Science, 74:1855-1874, 1995)に比べ、計算上は6倍効率的な単離を達成することができた。

【0006】

しかし、この方法を用いても、得られたマイクロサテライトDNAクローンの中には、なお問題を持ったものの混入を避けられなかった。すなわち、クローンの中で重複するものの割合が高く、単に効率性の問題のみならず、偏りを生じている恐れもある。

【0007】

マイクロサテライト配列は、種毎に単離する必要がある。解析に必要なマイクロサテライト配列の単離が進んでいる種は少なく、今後も多くの種からマイクロサテライト配列の単離を行う必要がある。しかし、たとえばニワトリのゲノムにおいてはマイクロサテライト配列の頻度が低いといったような、種に固有の問題点は多い。したがってマイクロサテライト配列の新たな単離技術の提供は、いろいろなアプローチの選択を可能とするという点においても有意義である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、単離効率に優れたサテライト配列の単離方法の提供を課題としている。本発明は、公知技術では達成することのできない、高度に効率化された単離方法を提供するものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、公知技術によるサテライト配列の単離にあたって、重複クローンが多く生じる主な原因のひとつがゲノムの断片化操作にあるのではないかと考えた。すなわち、制限酵素による切断では、配列特異的な切断が行われるので、ゲノムライブラリーに偏りが生じる可能性を否定できないのである。

【0010】

そこで本発明者らは、塩基配列に依存しない、よりランダムな切断が期待できる切断方法をゲノムの断片化に採用することを試みた。その結果、塩基配列に依存しないDNA消化酵素や物理的な作用に基づくゲノムの切断が可能なることを見出した。しかし、物理的に切断されたゲノムはその末端がリン酸化されておらず、ベクターへの酵素的な組み込みを効率的に行うことができない。また、物理的に切断された断片の切断部分は不規則に一方の鎖が突出した状態にあるため、ライゲーションもできない。本発明者らはこれらの問題点を、いくつかの酵素処理によって克服し、より均質なゲノムライブラリーを得る方法を確立した。更にこのライブラリーに基づいてサテライト配列の効率的な単離が可能となることを確認して本発明を完成した。なお本発明においてサテライト配列とは、特に断りの無い場合にはマイクロサテライト配列やミニサテライト配列を含む反復配列全般を意味する。なお本発明において、マイクロサテライト配列とは、2-5bpの、またミニサテライト配列は10-64bpの繰り返し単位からなる繰り返し配列を意味する。すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0011】

(1) 次のステップa) - b) を含むサテライト配列の単離方法であって、塩基配列に依存しない方法に基づいてゲノムを切断するサテライト配列の単離方法。

- a) ゲノムをランダムに切断した断片を得る工程、および
- b) 工程 a) の断片から、サテライト配列を含む断片を選択する工程、
- (2) 塩基配列に依存しない方法が、物理的な切断方法、または酵素的な切断方法である (1) のサテライト配列の単離方法。
- (3) 物理的な切断方法が超音波処理である (2) のサテライト配列の単離方法。
- (4) 超音波処理によって断片化されたゲノムの切断面を平滑末端とする請求項 3 のサテライト配列の単離方法。
- (5) 前記平滑末端処理をMung beanヌクレアーゼ処理およびT4DNAポリメラーゼ処理により実施する (4) のサテライト配列の単離方法。
- (6) 酵素的な切断方法が、塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼによるものである (2) のサテライト配列の単離方法。
- (7) 塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼが、DNaseIである (6) のサテライト配列の単離方法。
- (8) サテライト配列が、マイクロサテライト配列である (1) のサテライト配列の単離方法。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明では、塩基配列に依存しないランダムな断片を与える切断方法に基づいてゲノムの切断を行うことが重要な要件である。塩基配列に依存しない方法に基づくゲノムの切断とは、構造的な性質（すなわち塩基配列）に依存せずDNAの切断を行うことを意味する。したがって、塩基配列に依存してDNAを切断する化学的な反応や制限酵素による消化は、本発明における切断方法を構成しない。これらの作用による処理を加えるゲノムは、公知の方法により調整することができる。すなわち、細胞をプロテアーゼで酵素的に分解し、適当な溶媒でDNAを抽出する。

【0013】

塩基配列に依存しない方法に基づくゲノムの切断には、たとえば物理的な作用に基づく切断や、塩基配列を認識しないDNA消化酵素の作用に基づく切断方法を

示することができる。物理的な作用とは、超音波処理や攪拌等の作用を示すことができる。他方、塩基配列を認識しないDNA消化酵素としては、DNaseIなどが知られている。これらの作用は、いずれも本発明に応用することができる。しかし中でも超音波による処理は、再現性にも優れた望ましい操作のひとつである。超音波処理によれば、簡単な作業によって、短時間で均一な長さの断片を多量に得ることができる。これに対してDNaseIによるゲノムの部分消化では、均一な長さの断片を再現性良く得るには、厳密な条件設定が求められる。また操作性の点においても、煩雑なものとなりやすい。

## 【0014】

ゲノムの切断処理の程度は、目的とするサテライト配列に応じたサイズを持つ断片が効率的に得られる条件を経験的に設定すれば良い。たとえばマイクロサテライト配列の単離を目的とする場合には、ライブラリーとして300-900bp、の断片を与える処理条件を選択する。切断断片をベクターにライゲーションする操作を考慮すると、300-500bp、あるいは500-800bpの断片を多く生成する条件が望ましい。なぜならば、小さい断片の整数倍の大きさを持つ断片を含む場合、断片が互いにライゲーションしたものとの区別ができなくなってしまうからである。超音波処理を例にとると、氷冷下で20kHz振幅10の超音波処理を行う場合、1分間の処理を1-5回程度とすれば300-500bpの断片を効率的に得ることができる。超音波処理を長時間行くと試料の発熱を招き、DNAの変性をもたらす可能性があるので、短時間の処理を繰り返すようにするのが望ましい。

## 【0015】

超音波処理等の物理的な作用によって切断したゲノムは、ライゲーション効率が悪く、このままではベクターへの組み込みを能率的に行うことができない。そのため、望ましくは末端の平滑化を行う。本発明においては、Mung beanヌクレアーゼ処理およびT4DNAポリメラーゼを利用した平滑末端処理が有用である。Mung beanヌクレアーゼは1本鎖特異的エンドヌクレアーゼで、DNAの1本鎖部分を消化することによって平滑化を達成する。更にT4DNAポリメラーゼの作用により平滑化を確実にする。T4DNAポリメラーゼは、強力な3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を持ち3'突出末端を消化するとともに、3'陥没末端に対しては相補鎖を合成す

ることによって平滑末端を与える。ただT4DNAポリメラーゼは3' 陥没末端がリン酸基を持つ場合には平滑化できないので、Mung beanヌクレアーゼの併用が望ましい。このとき、Mung beanヌクレアーゼ処理は末端の平滑化とともに、超音波処理によって生じた2本鎖DNAのギャップ部分を切断する。その結果、目的の長さよりも短い断片を生じてしまう可能性がある。短い断片を含まないライブラリーを得るには、Mung beanヌクレアーゼ処理の後に目的の長さの断片を分離するステップを設けると良い。アガロース電気泳動やゲルろ過により、目的の長さの断片を分離することができる。平滑末端処理したゲノムの断片は、このままベクターへのライゲーションを行うことができる。あるいは、効率良くライゲーションを行うためにその5'末端をリン酸化することもできる。リン酸化にはT4ポリヌクレオチドキナーゼを利用する。

## 【0016】

5'末端をリン酸化したゲノム断片は、ベクターへのライゲーションにあたっては断片同士のライゲーションを起こす。これを避けるために、断片の濃度を低めにする一方、ベクターを過剰量で用いてベクターへのライゲーションの機会を増やすようにすると良い。ライゲーションにはT4DNAリガーゼをライゲーションバッファー中で作用させるが、このときにベクターの切断を行う制限酵素を共存させることによってライゲーションを効率的に進めることができる。たとえばpCR-ScriptSK(+)をベクターとして用いるとき、制限酵素SrfIの共存によりベクターを常に開環した状態に維持することができる。インサートとライゲーションしたベクターにはSrfIは作用しないので、ライゲーション効率の向上が期待できる。

## 【0017】

本発明においては、物理的な作用による切断のみならず、塩基配列に依存しないDNA消化酵素による断片化も可能である。このような酵素には、たとえばDNase I等が知られている。DNase Iによる酵素処理にあたっては、ゲノム全体に酵素が均等に作用するような条件を与え、更に期待する大きさの断片を効率的に得ることができる条件を経験的に設定する。たとえば、酵素作用の均一性を維持するためには、核タンパク質を取り除いてゲノムはできるだけ高純度なものをを用いるようにすると良い。また、酵素反応は、小さな断片を多量に生じないように迅速な

処理を心がける。また、再現性を高度に維持するには、反応時間や温度といった条件も正確に管理する必要がある。酵素反応終了後は、加熱などによって反応を停止し、核酸成分を回収し、更に必要に応じて特定の断片を抽出した後、上記のようなベクターへの組み込みを行う。酵素消化したゲノムの断片は、平滑末端となっており、リン酸化された状態にあるので、そのままライゲーションに使うことができる。

## 【0018】

本発明に用いられるベクターは特に限定されない。具体的には、pCR-ScriptSK(+), pBluescriptKS(+) (いずれもStratagene社製) やpUC18等の公知のベクターを利用すれば良い。インサートを含むベクターによって適当な宿主を形質転換し、増殖させた後にDNAを回収してゲノムライブラリーとする。pCR-ScriptSK(+ )による形質転換には、大腸菌(コンピテントセル) XLI-Blue MRF' や、XL2-Blue MRF'、あるいはTG1 (いずれもStratagene社製) のような形質転換効率に優れたものを利用すると有利である。

こうして構築したゲノムライブラリーをもとに、目的とするサテライト配列を含むものをクローニングする。サテライト配列のスクリーニングは、サテライト配列用のプローブを使ったコロニーハイブリダイゼーション(Can. J. Fish. Biol., 51:1959-1996, 1994)や、プライマーエクステンション(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3419-1423, 1992)に基づいて行うことができる。コロニーハイブリダイゼーションでは、前記形質転換細胞のコロニーをフィルターに転写し、たとえば(GT)<sub>n</sub>という繰り返し配列を持ったプローブとハイブリダイズさせる。なお、プローブを構成するオリゴヌクレオチドの塩基配列は、目的とするサテライト配列に応じて適宜設定する。陽性コロニーを分離することにより、サテライト配列を含むクローンの単離を進める。

## 【0019】

一方プライマーエクステンションでは、ゲノムライブラリーを1本鎖DNAとして回収する。たとえばpCR-ScriptSK(+)をベクターとして用いたとき、形質転換した大腸菌にヘルパーファージVCS-M13等を感染させて、組換えファージとしてインサートを1本鎖の形で回収することができる。ファージにパッケージングされ

たDNAには酵素作用が及ばないので、回収時に大腸菌に由来するRNAやDNAを酵素的に分解することができ、より効率的なクローニングを行うことができる。

#### 【0020】

ファージから抽出した1本鎖プラスミドDNAにサテライト配列特異プライマーをアニールさせてDNAポリメラーゼを作用させる。たとえば哺乳類のマイクロサテライト配列においては、(dA.dT) $n$ の繰り返し配列が一般的である(全ゲノムの0.3%)。またヒトでは、(dCA.dTG) $n$ 、あるいは(dCT.dAG) $n$ といった組み合わせも多く見られる。こういった情報を元に、これらの配列に相補的な塩基配列を持たせれば、サテライト配列にアニールするプライマーを設計することができる。このときプライマーの5'末端は、ライゲーションに備えて予めリン酸化しておくといい。マイクロサテライト配列を含むベクターは、この部分でプライマーを得て2本鎖合成が進むが、プライマーがアニールしないベクターは1本鎖のままである。DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の後にライゲーションを行って完全に2本鎖環状化し、Mung beanヌクレアーゼ等によって1本鎖DNAを分解すればサテライト配列を含むベクターが残る。これを回収して再び形質転換し、クローニングを行うことができる。クローニングされたサテライト配列を含むベクターを増殖させ、DNAを回収してその配列を決定すれば、サテライト配列の単離が完了する。

#### 【0021】

サテライト配列が周辺領域を含む形で単離されれば、PCRのためのプライマーを設計することができる。PCRプライマーの設計は、市販されている塩基配列の解析用ソフトウェアパッケージを利用すると便利である。たとえば以下に述べる実施例においては、プライマー設計ソフトPrimer Premier, Premier (Biosoft International製)を利用している。単離されたマイクロサテライト配列やミニサテライト配列は、種内のフィンガープリントマーカーとして、あるいは家系(系統)のマーカーとして有用である。以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

#### 【0022】

##### 【実施例】

##### (1) クロアウピDNA断片の調製

クロアワビ(*Haliotis discus discus*)DNAの抽出は、足部筋肉からTNEs-Urea法(Fisheries Sci., 62, 723-726, 1996)に準じて行った。ただし今回は4M 尿素を使用した。20  $\mu$ g/ml濃度のゲノムDNA溶液550  $\mu$ lを冷却しながら超音波処理して(20 kHz, Amplitude 10、1分間、5回.)、DNAを断片化した。10  $\mu$ g相当の基質DNA、30mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$ (pH4.6)、50mM NaCl、1mM  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$ 、5% グリセロールおよび60unitsのMung bean ヌクレアーゼ(東洋紡績製)を含む52  $\mu$ lの反応液を、37℃、1時間インキュベートして、DNA断片のギャップ部分の切断と末端を平滑化した。1.2%アガロースゲルで電気泳動を行って300-500bp.に当たるDNA断片を回収した。回収した基質DNA、20  $\mu$ M dNTP、50mM Tris/HCl(pH8.5)、7mM  $\text{MgCl}_2$ 、15mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM EDTAおよび10unitsのT4 DNA ポリメラーゼ(東洋紡績製)を含む100  $\mu$ lの反応液を、37℃、1時間インキュベートして、DNA断片の突出末端を平滑化した。さらに基質DNA、0.2mMrATP、50mM Tris/HCl(pH7.6)、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、10mM 2-メルカプトエタノールおよび10unitsのT4 ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡績製)を含む50  $\mu$ lの反応液を、37℃、1時間インキュベートして、DNA断片5'末端をリン酸化した。

## 【0023】

## (2) ゲノムDNA断片のプラスミドベクターへの連結

1  $\mu$ g相当のpCR-Script SK(+)ベクター(Stratagene製)、25mM Tris/Acetate(pH7.6)、100mM KOAc、10mM MgOAc、0.5mM 2-メルカプトエタノール、10  $\mu$ g/ml BSAおよび10unitsの制限酵素SrfI(Stratagene製)を含む10  $\mu$ lの反応液を、37℃、1時間以上インキュベートして、ベクターのSrfIサイトを切断した。調整したベクター溶液と、3  $\mu$ g相当の基質DNA、10unitsのSrfI、0.5mMrATP、66mM Tris/HCl(pH7.6)、6.6mM  $\text{MgCl}_2$ 、10mM ジチオスレイトールおよび20unitsのT4 DNAリガーゼ(東洋紡績製)を含む50  $\mu$ lの反応液を、24℃、一晩インキュベートしてDNA断片をベクターへ連結した。65℃、15分間加熱処理して、DNAリガーゼを失活させた後、SrfIをさらに10units加え、37℃、1時間インキュベートして、セルフライゲーションしたベクターを消化した。

## 【0024】

## (3) 1本鎖DNA(1本鎖DNA)の調整

5本の培養チューブに、XL2-Blue MRF<sup>+</sup> ultracompetent cells (Epicurian coli ultracompetent cells, Stratagene製)を100  $\mu$ lずつ入れ、各チューブに200ng相当のライゲーションしたベクターを加えて、添付解説書に従って形質転換した。各チューブに900  $\mu$ lのNZY培地 (Maniatis: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.)を加え、37℃、1時間振とう培養した後、アンピシリン (終濃度50  $\mu$ g/ml)を加え、更に37℃、1時間振とう培養して、形質転換された大腸菌を選択した。各チューブに10<sup>10</sup> pfu相当のVCS-M13 helper phageを加え、37℃、20分間静置後、カナマイシン (終濃度70  $\mu$ g/ml)を加えて37℃、1時間振とう培養して、ヘルパーファージが感染した大腸菌を選択した。各培養液をまとめて、アンピシリンおよびカナマイシンを含む100mlのTerrific培地 (Maniatis: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.)に入れ、37℃、14時間振とう培養した。培養したTerrific培地を、0℃、14,000rpmで10分間遠心して上澄みを回収し、45  $\mu$ mフィルターを用いた濾過を2回行った。常法 (村松正實: ラボマニュアル遺伝子工学, 第3版, 丸善, 東京, 1996, pp.51-55.)に従ってPEG沈殿を2回行った後、公知の方法 (Jpn. Poult. Sci., 33, 292-299, 1996)に従って大腸菌に由来するDNAとRNAを消化した。この後、PEG沈殿、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、1本鎖DNAを精製した。

#### 【0025】

##### (4) (CA)<sub>n</sub>陽性プラスミドの選別

(CA)<sub>12</sub>オリゴヌクレオチドを用いてプライマーエクステンションを行い、(TG/CA)<sub>n</sub>リピートを持つDNA断片が挿入されたプラスミドDNAを選別した。3  $\mu$ g相当の1本鎖DNA、0.2mM dNTP、20mM Tris/HCl (pH8.8)、10mM KCl、10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2mM MgSO<sub>4</sub>、100  $\mu$ g/ml BSA、0.1% Triton X-100および100pmolの(CA)<sub>12</sub>オリゴヌクレオチドを含む98  $\mu$ lの溶液を、72℃、10分間プレヒーティングした。この溶液に5unitsのPfu DNA ポリメラーゼ (Stratagene製)を加え、ミネラルオイルで重層し、72℃、30分間インキュベートした後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行って、生成した二本鎖DNAを回収し、10  $\mu$ lの滅菌水に溶解した。ライゲーションキット (Ligation high, 東洋紡績製)を用いて二本鎖DNAを閉環させた後、加熱

処理(65℃、15分間)によってDNAリガーゼを失活させた。この溶液と、30mM CH<sub>3</sub>COONa(pH4.6)、50mM NaCl、1mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn、5% グリセロールおよび30unitsのMung beanヌクレアーゼを含む100μlの反応液を、37℃、2時間以上インキュベートし、プライマーエクステンションされなかった1本鎖DNAを消化した。フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿によってDNAを回収し、60μlのTE Bufferに溶解した。

## 【0026】

回収されたDNA(1本鎖DNA100ng相当)をXL2-Blue MRF' Ultracompetent cellsへ形質転換した後、アンピシリン50μg/mlを含む2×YT寒天培地(Maniatis: Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,1989.)に展開し、37℃、一晚培養した。培養プレート上で、無作為にシングルコロニーをピックアップし、アンピシリン(終濃度50μg/ml)を含む2×YT培地(Maniatis: Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,1989.)2ml中で、37℃、一晚振とう培養した後、常法(ラボマニュアル遺伝子工学,第3版,丸善,東京,1996,pp. 51-55.)に従って、アルカリ法によるプラスミド抽出を行い、50μlのTE Bufferに溶解した。

## 【0027】

精製したプラスミドDNA(1本鎖DNA 4ng相当)を0.5N NaOHでアルカリ変性し、ナイロンメンブレン (No.1209299,Boehringer Mannheim)に浸透させ、120℃で30分間バークした。(CA)<sub>10</sub>オリゴヌクレオチドをDIGオリゴヌクレオチド標識キット(DIG Oligonucleotide Tailing Kit,Boehringer Mannheim、商品名)でジゴキシゲン標識したプローブと、DIG核酸検出キット(DIG Nucleic Acid Detection Kit,Boehringer Mannheim)を使用して、指示書にしたがって(CA)<sub>n</sub>陽性クローンの検出を行った。結果の一部を図1に示した。

## 【0028】

## (5) サイクルシーケンス

(CA)<sub>n</sub>陽性クローンについて、サイクルシーケンス法を用いて、塩基配列を決定した。シーケンス反応には、5'末端をCy5ラベルしたKSプライマーおよびRev

erse primerとシーケンスキット(ThermoSequence fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGPT, Amersham)を使用し、シーケンスには蛍光DNAシーケンサー(ALFexpress, Pharmacia)を使用した。得られた塩基配列のデータから、プライマー設計ソフト(Primer Premier, Premier Biosoft International製)によって、CAリピートを挟む領域で、最適なプライマーを設計した。以下に、単離したクロアウビのマイクロサテライト配列の塩基配列を示す。なお繰り返し単位がわかりやすいように、繰り返し単位を( )でまとめて記載した。実際の塩基配列は配列表に記載したとおりである(番号が配列番号に対応する)。1-24までの領域については、全てPCRのためのプライマーの設計が可能であり、このうち9の領域(1,3,8,10,13,15,16,19,24)については多型を確認することができた。

## 【0029】

1. (CA)<sub>41</sub>
2. (GACT)<sub>2</sub>(CTCA)<sub>7</sub>(CA)<sub>2</sub>CT(CA)<sub>9</sub>
3. C<sub>5</sub>CAC<sub>2</sub>(CA)<sub>12</sub>TA(CA)<sub>8</sub>
4. (CA)<sub>7</sub>
5. (CA)<sub>16</sub>
6. (GA)<sub>2</sub>CAGA(CA)<sub>5</sub>
7. CA<sub>3</sub>GA<sub>2</sub>C<sub>3</sub>A<sub>3</sub>(CA)<sub>5</sub>
8. (CGCA)<sub>9</sub>TGCAC<sub>2</sub>(CA)<sub>2</sub>
9. (CT)<sub>3</sub>(CA<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CA)<sub>5</sub>
10. (CA)<sub>25</sub>
11. CACT(CA)<sub>16</sub>TACA
12. CA<sub>3</sub>(CA)<sub>2</sub>T(CA)<sub>4</sub>
13. (CA)<sub>30</sub>
14. CA<sub>2</sub>GCA<sub>2</sub>C(CA)<sub>25</sub>
15. (CA)<sub>2</sub>CT(CA)<sub>13</sub>(CGCA)<sub>11</sub>(CA)<sub>6</sub>
16. (CA)<sub>8</sub>(CG)<sub>4</sub>

## 【0030】

17. (CA)<sub>6</sub>(CG)<sub>4</sub>
18. (CA)<sub>5</sub>
19. (CA)<sub>26</sub>
20. TACATA(CA)<sub>12</sub>
21. (CA)<sub>2</sub>CA<sub>3</sub>(CA)<sub>6</sub>
22. (CA)<sub>2</sub>AC(CA)<sub>3</sub>AC(CAC)<sub>2</sub>(CA)<sub>5</sub>
23. (CA)<sub>8</sub>(TGCA)<sub>2</sub>
24. (CA)<sub>34</sub>
25. (CA)<sub>7</sub>(CGCA)<sub>2</sub>CGA<sub>2</sub>(CGCA)<sub>2</sub>A<sub>2</sub>(CA)<sub>2</sub>(CG)<sub>2</sub>
26. (CA)<sub>8</sub>
27. CAC<sub>8</sub>(CA)<sub>9</sub>C<sub>4</sub>
28. (CA)<sub>6</sub>(GA)<sub>2</sub>
29. (CA)<sub>26</sub>
30. (CA)<sub>25</sub>
31. CAG(CA)<sub>5</sub>TACA
32. (CA<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CA)<sub>4</sub>CA<sub>3</sub>(CA)<sub>12</sub>G<sub>2</sub>CA(CG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>

【0031】

超音波を使って配列に依存しない切断方法に基づいて作製した(TG/CA)<sub>n</sub>濃縮ライブラリー(48クローン)のうち、約85%(41クローン)が(CA)<sub>n</sub>陽性クローンであった(図1)。このうち、無作為に選んだ32個の(CA)<sub>n</sub>陽性クローンのシーケンスを行った結果、24クローン(72%)でPCRプライマーの設計が可能であった。残りの9クローンでは、リピート領域がベクターとの連結点に隣接していること、リピートの途中でベクターと連結していること、あるいはDNA断片中にリピートが散在していることなどから、プライマーの設計は不可能であった。

【0032】

#### 【発明の効果】

本発明によれば、マイクロサテライト配列をはじめとするサテライト配列を効率的に単離することができる。本発明はゲノムの断片化に塩基配列に依存しない切断方法を利用するので、塩基配列による影響を受けず、偏りの無いライブラリ

一を得ることができる。偏りの無いライブラリーから単離されたサテライト配列には重複が少なく、効率的な単離を行えるのである。

【0033】

たとえばこれまでマイクロサテライト配列が単離されていなかったクロアウビにおいて、1度の操作で32クローンからなる(TG/CA)<sub>n</sub>濃縮ライブラリーを実現した。このライブラリーから得られたクローンには重複が無く、本発明者らがニワトリで試みた方法で重複が多かったことと比較すると、高度に効率化されているといえる。単に重複が少ないことのみならず、単離されるクローンがPCR用のプライマーを設計しうるものであることも特筆すべき効果である。たとえば実施例に示した例では、計算上培養プレート上の60%以上(0.85×24/32)のクローンからPCR用プライマーの設計が可能である。これらの成績により、本発明に基づくマイクロサテライト配列の単離方法は、汎用性を備えた優れた方法であることが明らかである。

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Research Institute of Agrobiological Resources

<120> Methods for Isolation of satellite Sequence.

<130> microsatellite

<140>

<141>

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 82

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 1

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60

cacacacaca cacacacaca ca 82

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 2

gactgactct cactcactca ctacactcact cactcacaca ctacacacaca cacacacaca 60

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 3

ccccccaccc acacacacac acacacacac acatacacac acacacacac a 51

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 4

cacacacaca caca

14

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 5

cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca

32

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 6

gagacagaca cacacaca

18

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 7

caaagaaccc aaacacacac aca

23

<210> 8

<211> 46

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 8

cgcacgcacg cacgcacgca cgcacgcacg cacgcatgca cccaca

46

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 9

ctctctcaac aacaacacac acaca

25

<210> 10

<211> 50

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 10

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca

50

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 11

cactcacaca cacacacaca cacacacaca cacatata

38

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 12

caaacacatc acacaca

17

<210> 13

<211> 60

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 13

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 14

caagcaacca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacaca 58

<210> 15

<211> 88

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 15

cacactcaca cacacacaca cacacacaca cacgcacgca cgcacgcacg cacgcacgca 60

cgcacgcacg cacgcacaca cacacaca 88

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 16

cacacacaca cacacacgcg cgcg 24

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 17

cacacacaca cacgcgcgcg 20

<210> 18

<211> 10

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 18

cacacacaca

10

<210> 19

<211> 52

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 19

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca

52

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 20

tacatacaca cacacacaca cacacacaca

30

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 21

cacacaaaca cacacacaca

20

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 22

cacaaccaca caaccaccac cacacacaca

30

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 23

cacacacaca cacacatgca tgca

24

<210> 24

<211> 68

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 24

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60

cacacaca

68

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 25

cacacacaca cacacgcacg cacgaacgca cgcaaacaca cgcg

44

<210> 26

<211> 16

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 26

cacacacaca cacaca

16

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 27

cacccccccc cacacacaca cacacacacc cc

32

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 28

cacacacaca cagaga

16

<210> 29

<211> 52

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 29

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca 52

<210> 30

<211> 50

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 30

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 50

<210> 31

<211> 17

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 31

cagcacacac acataca 17

<210> 32

<211> 55

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 32

caaacaaaca aacacacaca caaacacaca cacacacaca cacacacagg cacggcggcg 60

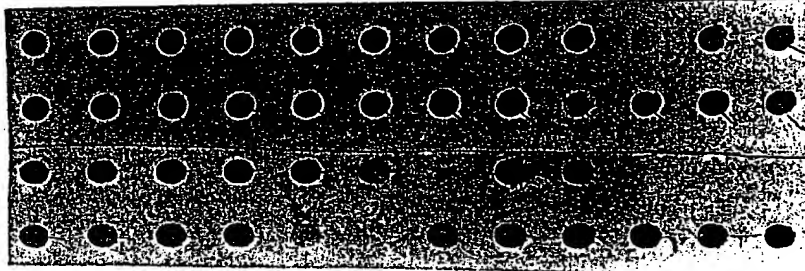
g 61

【図面の簡単な説明】

【図 1】 マイクロサテライト配列特異プローブ ((CA)<sub>10</sub>オリゴヌクレオチド) によるドットブロットアッセイの結果を示す発色像。

【書類名】 図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

サテライト配列の効率的な単離を可能とする方法の提供。

【解決手段】

ゲノムの切断を超音波処理等の塩基配列に依存しない切断方法に基づいて行うことにより、より均質なライブラリーを得る。このライブラリーからサテライト配列を選択することによって、単離効率が向上する。遺伝子マーカーとして有用なマイクロサテライト配列を効率的に単離することができる。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

591127076

【住所又は居所】

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

【氏名又は名称】

農林水産省農業生物資源研究所長

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲

|           |                      |
|-----------|----------------------|
| 【書類名】     | 手続補正書                |
| 【整理番号】    | MOA-004              |
| 【提出日】     | 平成11年 2月 1日          |
| 【あて先】     | 特許庁長官殿               |
| 【事件の表示】   |                      |
| 【出願番号】    | 平成10年特許願第232153号     |
| 【補正をする者】  |                      |
| 【識別番号】    | 591127076            |
| 【氏名又は名称】  | 農林水産省農業生物資源研究所長 桂 直樹 |
| 【代理人】     |                      |
| 【識別番号】    | 100102978            |
| 【弁理士】     |                      |
| 【氏名又は名称】  | 清水 初志                |
| 【手続補正 1】  |                      |
| 【補正対象書類名】 | 明細書                  |
| 【補正対象項目名】 | 特許請求の範囲              |
| 【補正方法】    | 変更                   |
| 【補正の内容】   | 1                    |
| 【手続補正 2】  |                      |
| 【補正対象書類名】 | 明細書                  |
| 【補正対象項目名】 | 0011                 |
| 【補正方法】    | 変更                   |
| 【補正の内容】   | 2                    |
| 【手続補正 3】  |                      |
| 【補正対象書類名】 | 明細書                  |
| 【補正対象項目名】 | 0012                 |
| 【補正方法】    | 変更                   |
| 【補正の内容】   | 3                    |

【手続補正 4】

【補正対象書類名】 明細書  
 【補正対象項目名】 0015  
 【補正方法】 変更  
 【補正の内容】 4

【手続補正 5】

【補正対象書類名】 明細書  
 【補正対象項目名】 0020  
 【補正方法】 変更  
 【補正の内容】 5

【手続補正 6】

【補正対象書類名】 明細書  
 【補正対象項目名】 0023  
 【補正方法】 変更  
 【補正の内容】 6

【手続補正 7】

【補正対象書類名】 明細書  
 【補正対象項目名】 0024  
 【補正方法】 変更  
 【補正の内容】 7

【手続補正 8】

【補正対象書類名】 明細書  
 【補正対象項目名】 0034  
 【補正方法】 変更  
 【補正の内容】 8  
 【ブルーフの要否】 要

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次のステップ a) - b) を含むサテライト配列の単離方法であって、塩基配列に依存しない方法に基づいてゲノムを切断するサテライト配列の単離方法。

a) ゲノムをランダムに切断した断片を得る工程、および

b) 工程 a) の断片から、サテライト配列を含む断片を選択する工程、

【請求項 2】 塩基配列に依存しない方法が、物理的な切断方法、または酵素的な切断方法である請求項 1 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 3】 物理的な切断方法が超音波処理である請求項 2 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 4】 超音波処理によって断片化されたゲノムの切断面を平滑末端とする請求項 3 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 5】 前記平滑末端処理を Mung beanヌクレアーゼ 処理および T4DNA ポリメラーゼ処理により実施する請求項 4 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 6】 酵素的な切断方法が、塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼによるものである請求項 2 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 7】 塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼが、DNaseI である請求項 6 のサテライト配列の単離方法。

【請求項 8】 サテライト配列が、マイクロサテライト配列である請求項 1 のサテライト配列の単離方法。

【0011】

(1) 次のステップa) - b) を含むサテライト配列の単離方法であって、塩基配列に依存しない方法に基づいてゲノムを切断するサテライト配列の単離方法。

a) ゲノムをランダムに切断した断片を得る工程、および

b) 工程a) の断片から、サテライト配列を含む断片を選択する工程、

(2) 塩基配列に依存しない方法が、物理的な切断方法、または酵素的な切断方法である(1)のサテライト配列の単離方法。

(3) 物理的な切断方法が超音波処理である(2)のサテライト配列の単離方法

(4) 超音波処理によって断片化されたゲノムの切断面を平滑末端とする請求項3のサテライト配列の単離方法。

(5) 前記平滑末端処理をMung beanヌクレアーゼ処理およびT4DNAポリメラーゼ処理により実施する(4)のサテライト配列の単離方法。

(6) 酵素的な切断方法が、塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼによるものである(2)のサテライト配列の単離方法。

(7) 塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼが、DNaseIである(6)のサテライト配列の単離方法。

(8) サテライト配列が、マイクロサテライト配列である(1)のサテライト配列の単離方法。

【0012】

## 【発明の実施の形態】

本発明では、塩基配列に依存しないランダムな断片を与える切断方法に基づいてゲノムの切断を行うことが重要な要件である。塩基配列に依存しない方法に基づくゲノムの切断とは、構造的な性質（すなわち塩基配列）に依存せずDNAの切断を行うことを意味する。したがって、塩基配列に依存してDNAを切断する化学的な反応や制限酵素による消化は、本発明における切断方法を構成しない。これらの作用による処理を加えるゲノムは、公知の方法により調製することができる。すなわち、細胞をプロテアーゼで酵素的に分解し、適当な溶媒でDNAを抽出する。

【0015】

超音波処理等の物理的な作用によって切断したゲノムは、ライゲーション効率が悪く、このままではベクターへの組み込みを能率的に行うことができない。そのため、望ましくは末端の平滑化を行う。本発明においては、Mung beanヌクレアーゼ処理およびT4DNAポリメラーゼを利用した平滑末端処理が有用である。Mung beanヌクレアーゼは1本鎖特異的エンドヌクレアーゼで、DNAの1本鎖部分を消化することによって平滑化を達成する。更にT4DNAポリメラーゼの作用により平滑化を確実にする。T4DNAポリメラーゼは、強力な3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を持ち3'突出末端を消化するとともに、3'陥没末端に対しては相補鎖を合成することによって平滑末端を与える。ただT4DNAポリメラーゼは3'陥没末端がリン酸基を持つ場合には平滑化できないので、Mung beanヌクレアーゼの併用が望ましい。このとき、Mung beanヌクレアーゼ処理は末端の平滑化とともに、超音波処理によって生じた2本鎖DNAのギャップ部分を切断する。その結果、目的の長さよりも短い断片を生じてしまう可能性がある。短い断片を含まないライブラリーを得るには、Mung beanヌクレアーゼ処理の後に目的の長さの断片を分離するステップを設けると良い。アガロース電気泳動やゲルろ過により、目的の長さの断片を分離することができる。平滑末端処理したゲノムの断片は、このままベクターへのライゲーションを行うことができる。あるいは、効率良くライゲーションを行うためにその5'末端をリン酸化することもできる。リン酸化にはT4ポリヌクレオチドキナーゼを利用する。

## 【0020】

ファージから抽出した1本鎖プラスミドDNAにサテライト配列特異プライマーをアニールさせてDNAポリメラーゼを作用させる。たとえば哺乳類のマイクロサテライト配列においては、(dA.dT) $n$ の繰り返し配列が一般的である(全ゲノムの0.3%)。またヒトでは、(dCA.dTG) $n$ 、あるいは(dCT.dAG) $n$ といった組み合わせも多く見られる。こういった情報を元に、これらの配列に相補的な塩基配列を持たせれば、サテライト配列にアニールするプライマーを設計することができる。このときプライマーの5'末端は、ライゲーションに備えて予めリン酸化しておくといい。マイクロサテライト配列を含むベクターは、この部分でプライマーを得て2本鎖合成が進むが、プライマーがアニールしないベクターは1本鎖のままである。DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の後にライゲーションを行って完全に2本鎖環状化し、Mung beanヌクレアーゼ等によって1本鎖DNAを分解すればサテライト配列を含むベクターが残る。これを回収して再び形質転換し、クローニングを行うことができる。クローニングされたサテライト配列を含むベクターを増殖させ、DNAを回収してその配列を決定すれば、サテライト配列の単離が完了する。

【0023】

## (2) ゲノムDNA断片のプラスミドベクターへの連結

1  $\mu$ g相当のpCR-Script SK(+)ベクター (Stratagene製)、25mM Tris/Acetate(pH7.6)、100mM KOAc、10mM MgOAc、0.5mM 2-メルカプトエタノール、10  $\mu$ g/ml BSA および10unitsの制限酵素SrfI (Stratagene製) を含む10  $\mu$ lの反応液を、37℃、1時間以上インキュベートして、ベクターのSrfIサイトを切断した。調製したベクター溶液と、3  $\mu$ g相当の基質DNA、10unitsのSrfI、0.5mM ATP、66mM Tris/HCl (pH7.6)、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、10mM ジチオスレイトールおよび20unitsのT4 DNAリガーゼ (東洋紡績製) を含む50  $\mu$ lの反応液を、24℃、一晩インキュベートしてDNA断片をベクターへ連結した。65℃、15分間加熱処理して、DNAリガーゼを失活させた後、SrfIをさらに10units加え、37℃、1時間インキュベートして、セルフライゲーションしたベクターを消化した。

【0024】

## (3) 1本鎖DNA(1本鎖DNA)の調製

5本の培養チューブに、XL2-Blue MRF<sup>+</sup> ultracompetent cells (Epicurian coli ultracompetent cells, Stratagene製)を100 $\mu$ lづつ入れ、各チューブに200ng相当のライゲーションしたベクターを加えて、添付解説書に従って形質転換した。各チューブに900 $\mu$ lのNZY培地(Maniatis:Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.)を加え、37℃、1時間振とう培養した後、アンピシリン(終濃度50 $\mu$ g/ml)を加え、更に37℃、1時間振とう培養して、形質転換された大腸菌を選択した。各チューブに10<sup>10</sup> pfu相当のVCS-M13 helper phageを加え、37℃、20分間静置後、カナマイシン(終濃度70 $\mu$ g/ml)を加えて37℃、1時間振とう培養して、ヘルパーファージが感染した大腸菌を選択した。各培養液をまとめて、アンピシリンおよびカナマイシンを含む100mlのTerrific培地(Maniatis:Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.)に入れ、37℃、14時間振とう培養した。培養したTerrific培地を、0℃、14,000rpmで10分間遠心して上澄みを回収し、45 $\mu$ mフィルターを用いた濾過を2回行った。常法(村松正實:ラボマニュアル遺伝子工学, 第3版, 丸善, 東京, 1996, pp.51-55.)に従ってPEG沈澱を2回行った後、公知の方法(Jpn. Poult. Sci., 33, 292-299, 1996)に従って大腸菌に由来するDNAとRNAを消化した。この後、PEG沈澱、フェノール抽出、エタノール沈澱を行い、1本鎖DNAを精製した。

【0 0 3 4】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Research Institute of Agrobiological Resources

<120> Methods for Isolation of satellite Sequence.

<130> microsatellite

<140>

<141>

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 82

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 1

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60

cacacacaca cacacacaca ca

82

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 2

gactgactct cactcactca ctcactcact cactcacaca ctcacacaca cacacacaca 60

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 3

ccccccaccc acacacacac acacacacac acatacacac acacacacac a 51

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 4

cacacacaca caca 14

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 5

cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca 32

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 6

gagacagaca cacacaca

18

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 7

caaagaaccc aaacacacac aca

23

<210> 8

<211> 46

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 8

cgcacgcacg cacgcacgca cgcacgcacg cacgcatgca cccaca

46

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 9

ctctctcaac aacaacacac acaca

25

<210> 10

<211> 50

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 10

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca

50

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 11

cactcacaca cacacacaca cacacacaca cacacataca

40

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 12

caaacacatc acacaca

17

<210> 13

<211> 60

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 13

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 14

caagcaacca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacaca 58

<210> 15

<211> 88

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 15

cacactcaca cacacacaca cacacacaca cacgcacgca cgcacgcacg cacgcacgca 60  
cgcacgcacg cacgcacaca cacacaca 88

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 16

cacacacaca cacacacgcg cgcg

24

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 17

cacacacaca cacgcgcgcg

20

<210> 18

<211> 10

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 18

cacacacaca

10

<210> 19

<211> 52

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 19

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca

52

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 20

tacatacaca cacacacaca cacacacaca

30

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 21

cacacaaaca cacacacaca

20

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 22

cacaaccaca caaccaccac cacacacaca

30

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 23

cacacacaca cacacatgca tgca

24

<210> 24

<211> 68

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 24

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60  
cacacaca 68

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 25

cacacacaca cacacgcacg cacgaacgca cgcaaacaca cgCg 44

<210> 26

<211> 16

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 26

cacacacaca cacaca 16

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 27

cacccccccc cacacacaca cacacacacc cc

32

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 28

cacacacaca cagaga

16

<210> 29

<211> 52

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 29

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca

52

<210> 30

<211> 50

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 30

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca

50

<210> 31

<211> 17

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 31

cagcacacac acataca

17

<210> 32

<211> 55

<212> DNA

<213> *Haliotis discus discus*

<400> 32

caaacaaaca aacacacaca caaacacaca cacacacaca cacacacagg cacggcggcg 60

61

g

認定・付加情報

|         |                    |
|---------|--------------------|
| 特許出願の番号 | 平成10年 特許願 第232153号 |
| 受付番号    | 59900084510        |
| 書類名     | 手続補正書              |
| 担当官     | 岡田 幸代 1717         |
| 作成日     | 平成11年 5月25日        |

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】

591127076

【住所又は居所】

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

【氏名又は名称】

農林水産省農業生物資源研究所長

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6

階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

特平10-232153

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591127076]

1. 変更年月日

1991年 5月16日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1の2

氏 名

農林水産省農業生物資源研究所長